



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

Estudio anatómico histológico e identificación de antígenos de angiotensina y endotelina en los vasos sanguíneos de la placenta de alpaca (*Vicugna pacos*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal
con mención en Producción y Reproducción Animal

AUTOR

Emanuel Ismael AYALA CHUNGA

ASESOR

MSc. Alberto SATO SATO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ayala, E. Estudio anatómico histológico e identificación de antígenos de angiotensina y endotelina en los vasos sanguíneos de la placenta de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2019.

METADATA COMPLEMENTARIA

ORCID DEL ASESOR: 0000-0002-0028-7342 MSc. Alberto Sato Sato

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: ANATOMÍA VETERINARIA “ANATOVET”

INSTITUCIÓN DE FINANCIAMIENTO: Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica- FONDECYT

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA INVESTIGACIÓN: Laboratorio De Anatomía Veterinaria De La Facultad De Medicina Veterinaria. Av. Circunvalación cuadra 28 – San Borja-Lima-Perú. Coordenadas 12° 3' 0" S, 77° 2' 0" W

AÑO DE INVESTIGACIÓN: 2016-2019

DNI: 45202052



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN PRODUCCIÓN Y
REPRODUCCIÓN ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día martes 25 de junio de 2019, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la MSc. Rosa Perales Camacho (**presidenta**) y constituido por los siguientes miembros: MSc. Alberto Sato Sato (**Asesor**), Mg. Libertad Alzamora Gonzales, Dr. Alexei Santiani Acosta, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

“Estudio anatómico histológico e identificación de antígenos de angiotensina y endotelina en los vasos sanguíneos de la placenta de alpaca (*Vicugna pacos*)”,
presentado por el Bachiller:

EMANUEL ISMAEL AYALA CHUNGA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: QUINCE (15) BUENO__


A continuación, la Presidenta del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal**, al Bachiller: **Emanuel Ismael Ayala Chunga**


Siendo las 12:00 horas del día martes 25 de junio de 2019, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.


.....
MSc. Rosa Perales Camacho (P.P.D.E.)
Presidenta


.....
MSc. Alberto Sato Sato (P. Emérito)
Miembro (Asesor)


.....
Dr. Alexei Santiani Acosta (P.P.T.C.)
Miembro


.....
Dra. Libertad Alzamora Gonzales (P.P.D.E.)
Miembro


.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

Dedicatoria

A mi madre Mabel Chunga Nolasco, mi padre, hermanos (as), primo, sobrinos (as) por su apoyo constante y aliento que me brindan en mi carrera profesional con el propósito de lograr un mejor bienestar dentro de la familia.

A mi amada esposa Delia Rumiche Ramirez por estar en cada momento feliz y difícil de mi vida, brindándome siempre consejos morales para lograr mis objetivos, como el lograr ser un exitoso magíster.

Agradecimientos

Al Dr. Alberto Sato Sato, maestro y guía de la investigación de tejidos placentarios de la alpaca. Mis sinceros agradecimientos por su apoyo incondicional y creer en un nuevo profesional para el mundo de la investigación de la anatomía animal.

A la Dra Miluska Navarrete Zamora por sus sabios consejos como profesional veterinario, por su contribución en la formación de un nuevo profesional dirigido hacia la docencia.

A Felipe Ramos Echevarria, admirable amigo y colega, promoción de pregrado de la universidad, por sus palabras de aliento “Vamos Emanuel tú puedes” que en su momento hicieron alcanzar los objetivos trazados.

A mis amigos, Nataly Ramos, Adriana Urviola, Francisco Santos, grandiosos Médicos veterinarios que de alguna u otra manera me hicieron sentir como parte de su familia.

Al convenio 097-2014-FONDECYT-DE por el financiamiento a la presente tesis de maestría.

A todos ellos mis agradecimientos profundos, sinceros y eternos.

ÍNDICE

Resumen	V
Abstract	Vi
Lista de tablas	Vii
Lista de figuras	Viii
Lista de anexos	Ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
1.Características anatómicas de la placenta	3
2.Placentación en camélidos	4
3.Irrigación fetal del camello dromedario	4
4.Inmunohistoquímica	5
5.Reacción cruzada	5
6.Técnica Avidina-Biotina-Peroxidasa	5
7.Angiotensina	6
8.Receptores de angiotensina II	7
9.Endotelina	7
10.Receptores de endotelina	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
1.Lugar de ejecución y periodo de duración	9
2.Descripción del material experimental	9
3.Términos de ética	9
4.Toma y procesamiento de tejidos	10
5.Estudio macroscópico	10
6.Estudio microscópico	10
7.Estudio inmunohistoquímico	11
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
1.Descripción macroscópica de la irrigación placentaria partiendo desde el cordón umbilical.	13
2.Descripción microscópica por tinción hematoxilina-eosina de arteria y vena umbilical	15
3.Descripción microscópica por Tinción tricrómico de Masson de arteria y vena umbilical tercer tercio de gestación.	20
4.Identificación mediante Inmunohistoquímica de los antígenos de angiotensina y endotelina en las células de los vasos sanguíneos del cordón umbilical.	22
V. CONCLUSIONES	33
VI. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	34
VII. ANEXOS	37

RESUMEN

La finalidad de esta investigación es describir la anatomía macroscópica, microscópica e identificar antígenos de angiotensina y endotelina en la placenta de alpaca. La parte experimental se realizó en el camal municipal de Huancavelica, Perú. Se procesó las muestras en el área de Investigación Morfológica del LAAFS FMV-UNMSM. Se utilizaron en total 12 úteros grávidos de primer, segundo y tercer tercio de gestación destinados al camal por descarte fenotípico. Se describió la parte macroscópica de la placenta partiendo desde el cordón umbilical. Además, se trabajaron cortes histológicos de cordón umbilical de 5 µm de espesor con la coloración H&E y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) utilizando reactivos de IHQ, anticuerpos policlonales (anti-Angiotensina y anti-Endotelina), continuando el protocolo de inmunohistoquímica ABC. La descripción histológica se realizó con el microscopio binocular Leica DM750 con cámara digital anexada. Cualitativamente fue clasificada la intensidad de marcación. El control positivo fue placenta de ovino. En el estudio macroscópico se evidenció la presencia de dos arterias y dos venas umbilicales, ambas venas forman anastomosis en la irrigación placentaria. Para el estudio microscópico los cortes de H-E definieron 3 capas de revestimiento de arteria y vena umbilical, una capa íntima, media o muscular y otra laxa, en las arterias la capa muscular se subdivide en subcapa compacta con abundante tejido conectivo y otra subcapa esponjosa donde se ubican las células musculares lisas. En el estudio IHQ se observó intensidad de marcación fuerte y moderada para antígenos de angiotensina en las células musculares lisas de arterias y venas respectivamente, en los tres tercios de gestación; e intensidad moderada para antígenos de endotelina en el endotelio vascular de arterias y venas del primer tercio de gestación.

Palabras clave: Alpaca, placenta, inmunohistoquímica, angiotensina, endotelina.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the macroscopic, microscopic anatomy and identify angiotensin and endothelin antigens in the alpaca placenta. The experimental part was done in the municipal slaughterhouse of Huancavelica, Peru. The samples were processed in the Morphological Research area of the LAAFS FMV-UNMSM. Twelve gravid uterus of first, second and third pregnant were used for phenotypic discarding. The macroscopic part of the placenta starting from the umbilical cord was described. In addition, 5 μ m thick umbilical cord histological sections with H-E staining and immunohistochemistry (IHC) techniques were used using IHC kits, polyclonal antibodies (anti-Angiotensin and anti-Endothelin), following the ABC immunohistochemistry protocol. The samples were read with the Leica DM750 binocular microscope with built-in digital camera. The intensity of the marking was classified qualitatively. The positive control was sheep placenta. In the macroscopic study it was evidenced the presence of two arteries and two umbilical veins, both veins form anastomosis in the placental irrigation. For the microscopic study, the H-E sections defined three layers of umbilical artery and vein lining, an intimate, middle or muscular layer and a lax layer. For the arteries, the muscular layer is subdivided into dense sublayer with abundant connective tissue and another non-dense sublayer with abundant smooth muscle cells. In the IHC study, strong and moderate labeling intensity was observed for angiotensin antigens in muscular layer of umbilical arteries and veins respectively for three thirds of pregnant; and moderate intensity for endothelin antigens in endothelial cells of umbilical artery and vein for first thirds of pregnant.

Key words: Alpaca, placenta, immunohistochemistry, angiotensin, endothelin.

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Anticuerpos y reactivos empleados para la inmunohistoquímica en vasos sanguíneos de la placenta de alpaca.	11

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01	Irrigación placentaria de alpaca tercer tercio de gestación 14
Figura 02	Irrigación placentaria venosa de alpaca tercer tercio de gestación 14
Figura 03	Arteria umbilical, primer tercio de gestación (H&E 10x) 16
Figura 04	Vena umbilical, primer tercio de gestación (H&E 10x) 16
Figura 05	Arteria umbilical, segundo tercio de gestación (H&E 40x) 17
Figura 06	Arteria umbilical, segundo tercio de gestación (H&E 4x) 18
Figura 07	Vena umbilical segundo tercio de gestación (H&E 10x) 18
Figura 08	Arteria umbilical, tercer tercio de gestación (H&E 4x) 19
Figura 09	Vena umbilical, tercer tercio de gestación (H&E 4x). 20
Figura 10	Arteria umbilical, tercer tercio de gestación (Masson 4x) 21
Figura 11	Vena umbilical, tercer tercio de gestación (Masson 4x) 21
Figura 12	Arteria umbilical, primer tercio de gestación, antígeno angiotensina (IHQ, contraste H&E 10x) 22
Figura 13	Vena umbilical, primer tercio de gestación, antígenos de angiotensina (IHQ, contraste H&E 10x) 23
Figura 14	Arteria umbilical, segundo tercio de gestación, antígenos de angiotensina (IHQ, contraste H&E 4x) 24
Figura 15	Vena umbilical, segundo tercio de gestación, antígenos de angiotensina (IHQ, contraste H&E 4x) 24
Figura 16	Arteria umbilical, tercer tercio de gestación, antígenos de angiotensina (IHQ, contraste H&E 4x) 25
Figura 17	Vena umbilical, tercer tercio de gestación, antígenos de angiotensina (IHQ, contraste H&E 4x) 26
Figura 18	Arteria umbilical, primer tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 10x) 27
Figura 19	Arteria umbilical, primer tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 40x) 27
Figura 20	Vena umbilical, primer tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 10x) 28
Figura 21	Vena umbilical, primer tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 40x) 28
Figura 22	Arteria umbilical, segundo tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x) 29
Figura 23	Vena umbilical, segundo tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x) 30
Figura 24	Arteria umbilical, tercer tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x) 31
Figura 25	Vena umbilical, tercer tercio de gestación, antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x) 31

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1	Protocolo de inmunohistoquímica	Pág. 37
Anexo 2	Medidas biparietal de feto	39

I. INTRODUCCIÓN

Las alpacas (*Vicugna pacos*) no considerado rumiante, habitan en los duros climas de las tierras altas del Perú, Bolivia, Argentina y Chile, donde las temperaturas caen bajo cero por la noche. Estas especies prefieren baja humedad y altitudes entre 3600 y 4900 metros, convierten con eficiencia los pastos nativos en carne y fibras de muy buena calidad (Iñiguez y Alem, 1996), convirtiéndolos en el mejor medio de sustento para muchos habitantes de escasos recursos en los países andinos de Sudamérica (Quispe *et al.*, 2009).

Reproductivamente, las alpacas fecundan e implantan un solo embrión en el cuerno izquierdo del útero (Olivera *et al.*, 2003). Durante la implantación el trofoblasto da origen al desarrollo de la placenta, mientras que el embrioblasto al desarrollo del feto. En humanos y cerdos, los péptidos angiotensina y endotelina son responsables de la angiogénesis placentaria y del desarrollo fetal durante la gestación (Nielsen *et al.*, 1996).

El desarrollo y crecimiento vascular sanguíneo esta mediada por moléculas de angiotensina y endotelina (Risau & Ingo, 1995), las cuales son responsables de la permeabilidad (Peach, 1981 y Woods, 1993), del control de la irrigación (Brameld *et al.*, 2011; Dvorak *et al.*, 1995), y del paso de agua hacia la placenta regulando de esta manera los fluidos amnióticos y alantoides (Faber y Anderson, 1992).

A grandes altitudes, la presión atmosférica y los niveles de oxígeno son reducidos, en estas condiciones ambientales, las alpacas han logrado desarrollar un mecanismo de compensación para la nutrición y oxigenación fetal. Una mayor irrigación sanguínea placentaria, mayor actividad biológica de las moléculas de angiotensina y endotelina a nivel de músculo liso vascular placentario pueden ser los factores que aseguran la supervivencia fetal.

Estos factores de supervivencia fetal de la alpaca aún no se han demostrado en su fisiología reproductiva. Por esta razón, se decidió dar los primeros pasos al identificar antígenos de angiotensina y endotelina en los vasos sanguíneos de la placenta mediante el uso de la

inmunohistoquímica, así como también contribuir con la anatomía macroscópica y microscópica de la irrigación placentaria de la alpaca (*Vicugna pacos*).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Características anatómicas de la placenta

La placenta, órgano transitorio de la gestación donde se aloja el nuevo ser, es un tejido que no posee inervación, siendo la comunicación materno-fetal mediante sustancias que se transportan vía sanguínea, las cuales ejercen una acción local al actuar dentro de la placenta o a distancia en el útero o el feto (Gudea *et al.*, 2004). En los mamíferos el desarrollo del feto depende únicamente de la placenta, la cual está compuesta por tejidos de la madre y del feto. El corion es el tejido que representa al feto, y de acuerdo al tipo de tejido placentario, está estrechamente adherido con el saco vitelino o el alantoides, la zona externa del endometrio uterino, representa a la madre (Roa *et al.*, 2012). La placenta impone la comunicación sanguínea materno-fetal, permitiendo el intercambio gaseoso y metabólico. Así mismo, es capaz de segregar hormonas y elaborar una barrera que divide los dos sistemas inmunes logrando así la supervivencia del nuevo ser (Roa *et al.*, 2012).

La clasificación de este órgano transitorio está dada por la cantidad de membranas que dividen o separan la sangre fetal y maternal, la mayor cantidad son seis capas, las cuales son tres por el lado fetal y tres por el lado materno. Las estructuras fetales son: epitelio corial fetal, mesenquimático fetal y endotelio capilar del feto. Mientras que las membranas maternas se expresan como: epitelio de la mucosa uterina, tejido conjuntivo uterino, endotelio de los capilares uterinos (Roa *et al.*, 2012). En la placentación de tipo difusa las vellosidades del corion son pequeños y se dispersan a lo largo de la superficie de la placenta fetal; estas toman íntimo contacto con las depresiones del epitelio uterino. Las características de estas placentas se pueden ubicar en cerdos, yeguas, burras y camélidos (Dellman, 1993).

Biológicamente, la placenta de alpaca expone la interacción de estructuras materno-fetales responsables de mantener el desarrollo y viabilidad de la nueva cría, desde su concepción hasta el nacimiento. Es un órgano biológicamente compuesto que responde a los diferentes cambios

hormonales y moleculares cuya expresión es observada en la morfodinámica de los elementos que lo constituyen (Olivera *et al.*, 2003).

2. Placentación en camélidos

Los camélidos sudamericanos describen una placentación epiteliocorial difusa, lugar donde la nutrición histiotrófica, producción de hormonas, y el intercambio molecular son frecuentes (Olivera *et al.*, 2003). A lo largo de la gestación, el trofoblasto forma una sola capa de células que incluye células mononucleadas, multinucleadas, y células gigantes, todas descansando sobre un mesénquima ricamente vascularizado (Olivera *et al.*, 2003). Así, en las llamas gestantes, la cara interna de la placenta muestra cantidades relativas de vasos sanguíneos, no se observa estructuras anatómicas semejantes a placentomas (Iturrizaga *et al.*, 2005). Las células trofoblásticas presentan una morfología variable, tales como: cúbicas, redondas y casi triangulares (Fowler y Olander 1990). En la mayoría de las células multinucleares presentan nucleolos basófilos; además, células trofoblásticas gigantes ubicadas en la parte superior de las proyecciones coriónicas y son fácilmente distinguibles por su citoplasma basófilo que contiene 5 o incluso más núcleos. Los vasos sanguíneos de diámetros diferentes, proximales a la capa trofoblástica, se encontraron interconectadas con las células trofoblásticas, formando una red subtrofoblástica (Iturrizaga *et al.*, 2005).

En las alpacas el periodo de gestación es de 11,5 meses (Burton *et al.*, 2006). En su último tercio de gestación, epitelios tanto coriónicos y uterinos están profundamente estrechados por los capilares de la placenta, por lo que la distancia mínima intercapilar a través de la vía de difusión puede ser tan poco como 2 μ . Esta distancia parece ser menor que la encontrada en la placenta epiteliocorial de cualquier otra especie de ungulado doméstico en la gestación tardía, puede ser una de varias adaptaciones de la gestación a gran altura (Steven *et al.*, 1980)

3. Irrigación fetal del camello dromedario

El camello es considerado un auquénido ancestral con similar morfología y fisiología a los camélidos sudamericanos. El cordón umbilical del camello dromedario está formado por 2 venas y 2 arterias, ambas venas transportan sangre oxigenada e ingresan al feto uniéndose en el sinus venoso intraabdominal formando una sola vena el cual se une a la vena porta. Entre la vena porta y la vena cava caudal existe el ducto venoso. La sangre materna sigue su curso a través del ducto venoso e ingresa por la vena cava caudal hacia la aurícula derecha del corazón, desde ahí

la sangre oxigenada pasa hacia la aurícula izquierda a través del foramen oval para distribuirse hacia todo el cuerpo desde el ventrículo izquierdo (Sabah *et al.*, 2013).

Las 2 arterias umbilicales emergen desde la arteria aorta cerca de la arteria iliaca externa, retornando con la sangre desoxigenada hacia la placenta para el intercambio feto maternal (Sabah *et al.*, 2013).

4. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es un procedimiento técnico, cuya finalidad es identificar determinantes antigénicos, en muestras de tejidos mediante la adición directa de anticuerpos policlonales o monoclonales. En muestras histológicas logra la ubicación exacta de su expresión antigénica y su correlación con los parámetros morfológicos, incrementando la sensibilidad y especificidad del objeto a identificar, además de ofrecer información adicional esencial en muchos casos (Yang *et al.*, 2011).

5. Reacción cruzada

La IHQ se basa en la identificación de un tejido (de una o varias especies) que posee la capacidad antigénica por un anticuerpo específico, en cuya molécula se acoplan estructuras biológicas con actividad enzimática, en especial la peroxidasa de rábano, denominada, técnica de inmunoperoxidasa. Al finalizar, se agrega a la sección citológica un compuesto del sustrato de la enzima empleada, además de una sustancia cromógena, que tomara una apariencia distinta después de originarse la reacción del sustrato y la enzima (Urpegui *et al.*, 2000).

La reacción del anticuerpo específico por un determinante antigénico en varias especies se denomina reacción cruzada. Así, en la identificación de proteínas receptores de angiotensina y endotelina en humanos puede reaccionar a otras especies como en ratones y bovinos (Laboratorio US Biological Life Sciences).

6. Técnica avidina-biotina-peroxidasa

Para la identificación de la angiotensina y endotelina se empleó la técnica Avidina – Biotina – Peroxidasa. Dicha técnica está basada en la elevada afinidad que tiene la glicoproteína avidina, por la vitamina biotina, esta característica, no se demuestra en los anticuerpos comunes. Esta propiedad logra visualizar mejor la intensidad del marcaje al amplificar la reacción

(Doherty *et al.*, 1989). Seguido a la incubación de las láminas citológicas con el anticuerpo primario, se agrega un segundo anticuerpo anexo a una molécula de biotina. Seguidamente, se cultiva con un complejo compuesto por metabolitos de avidina y biotina unidas a la enzima peroxidasa, en el cual debe prevalecer una relación de 4 a 1 (avidina:peroxidasa) para que logre acoplarse a la biotina que se encuentran unidas al anticuerpo secundario (Urpegui *et al.*, 2000).

7. Angiotensina

La gestación normal y la reproducción en conjunto (ovulación, implantación, y placentación) dependen de la angiogénesis y la producción de factores angiogénicos que regulan el crecimiento, el desarrollo, la regresión de los vasos y la proliferación estimulante de células y tejidos (Risau y Ingo, 1995). La angiotensina es un octapéptido del sistema renina angiotensina (SRA) con mayor actividad biológica, ejerce numerosas acciones en el sistema cardiovascular, renal, y endocrino, incluyendo vasoconstricción, regulación de la secreción de aldosterona y balance electrolítico (Peach, 1981). Se encuentran en los pequeños vasos controlando el flujo sanguíneo en la placenta de la mujer. Además, bajo circunstancias normales la angiotensina II incrementa la reabsorción de glucosa mediado por la insulina (Cooper *et al.*, 2007). La glucosa es el primer sustrato de energía para el feto (Brameld *et al.*, 2011).

La angiotensina II interviene en la estimulación del factor de crecimiento (IGF 1) mediado por la insulina (Ma *et al.*, 2006). La enzima convertidor de angiotensina es la principal enzima encargada de la síntesis de la angiotensina II y se encuentra en los vasos sanguíneos de la placenta en la mujer (Brameld *et al.*, 2011). Un estudio en el porcino mostraron elevadas cantidades de receptores para angiotensina II (AT2) a lo largo del todo el útero en gestación, obtenidos a partir de la homogenización de 2 g de tejido uterino en 20 ml de 50 mM/L Tris HCl (pH 7.4) + 10 mM/L de EDTA y 1 mM/L fenilmetilsulfo flourede a centrifugación de 200 rpm a 0 °C, los resultados de AT2 se expresaron en $\mu\text{mol/L}$ (Nielsen *et al.*, 1996).

Tejidos reproductivos donde interviene el Sistema Renina Angiotensina (RAS) se han identificado en el ovario y en la unidad uteroplacentaria en el cual regula la resistencia vascular y el flujo sanguíneo (Woods 1993). En el ovario de rata y de conejo el RAS tisular participa en la regulación de la maduración ovocitaria, la ovulación y la esteroidogénesis (Nielsen *et al.*, 1995). Otro estudio plantea que el RAS interviene en la homeostasis, el paso de agua hacia la placenta regulando de esta manera los fluidos amnióticos, alantoides (Faber *et al.*, 1992). Además, el RAS incrementa la permeabilidad y estimula la angiogénesis durante la placentación, así durante el parto la angiotensina II estimula contracción de las células musculares del miometrio (Mackenzie *et al.*, 1999).

8. Receptores de angiotensina II

La Angiotensina II es un agente muy potente que incrementa la presión sanguínea al actuar en el músculo liso, es más eficaz que la noradrenalina (Kaschina y Unger, 2003). Existen dos tipos de receptores para angiotensina II, AT1 y AT2. Al actuar en los AT1 controla fluidos biológicos, mientras que en los AT2 estimula la apoptosis (Allen *et al.*, 2000). Así mismo, realiza su efecto en la zona glomerulada de la corteza suprarrenal estimulando la biosíntesis y secreción de aldosterona, en el túbulo proximal aumenta la resorción de sodio e inhibe la secreción de renina, y en el sistema nervioso estimula la ingestión de agua y aumenta la secreción de vasopresina (Kaschina y Unger, 2003).

Se ha demostrado la presencia de receptores en grandes cantidades de Angiotensina II subtipo AT2 y renina en ovarios de bovino y cerdos, siendo en esta última especie donde se ha hallado en la placenta y membranas fetales durante toda su gestación (Nielsen *et al.*, 1996).

9. Endotelina

La formación de la red vascular en la placenta, la circulación fetoplacentaria, y el flujo sanguíneo útero-placentario determina el curso de la gestación y el crecimiento fetal intrauterino (Krukier y Pogorelova, 2005). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es uno de los principales activadores de la angiogénesis en el sistema reproductor femenino. VEGF induce la angiogénesis y aumenta la permeabilidad vascular (Dvorak *et al.*, 1995). Estos procesos implican también una variedad de factores que regulan el tono vascular en el sistema uteroplacentario-fetal. La endotelina tiene particular importancia en este proceso (Krukier y Pogorelova, 2005).

El papel del cordón umbilical en la regulación del flujo sanguíneo fetoplacentaria en la unidad placentaria-fetal está poco estudiado. Debe hacerse hincapié en que el endotelio de los vasos umbilicales puede servir como una fuente adicional de sustancias vasoactivas y angiogénicos en circulación fetal. La disminución de vasoconstrictor influye en la placenta y el cordón umbilical mejora los parámetros hemodinámicos y previene el aborto (Krukier y Pogorelova, 2005).

10. Receptores de endotelina

Se han caracterizado dos tipos de receptores de alta afinidad que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a Proteína G, a través de las cuales median sus efectos las endotelinas, los receptores de endotelinas han sido clasificados como receptores de endotelinas tipo A (ETA) y tipo B (ETB). La endotelina ejerce su acción a nivel vascular en forma directa sobre sus receptores de tipo A produciendo vasoconstricción, y cuando hace contacto con su receptor de tipo B produce vasodilatación. Los receptores tipo A se ubican en las células musculares lisas, mientras que las de tipo B se ubican en las células endoteliales (Flores, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución y periodo de duración

Se obtuvieron doce placentas de alpaca raza Huacaya, cuatro placentas por cada trimestre de gestación. Del total de las doce placentas, cuatro placentas pertenecieron al estudio "CONVENIO 097-2014-FONDECYT-DE", mientras que las ocho placentas restantes fueron recolectadas inmediatamente después del beneficio en el camal municipal de la provincia de Huancavelica (4 mil msnm) en los meses de mayo, julio y setiembre del 2016. Las placentas fueron conservadas a 8 °C en una caja hermética con hielo, y transportadas durante 10 horas hacia el Laboratorio de Anatomía Animal y Fauna Silvestre de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Descripción del material experimental

Se emplearon 12 úteros grávidos, los cuales fueron diseccionados para extraer la placenta y su vascularización. El cordón umbilical fue ubicado y cortado en la región proximal del feto, separando de esta manera la irrigación placentaria del feto. Inmediatamente, el diámetro biparietal fetal fue medido con la regla de Vernier para estimar la edad fetal y/o el tercio de gestación. (Gazitua *et al.*, 2001) (Anexo 2).

Términos de ética

Los 12 úteros grávidos (alpacas) utilizadas para este estudio fueron obtenidos de crías alpaqueras descartadas por características fenotípicas tales como estatura, condición corporal o fortaleza de miembros anteriores y posteriores, destinados a camal, concordando de esta manera con las normas establecidas por el comité de ética y bienestar animal pertenecientes a la FMV-UNMSM.

Toma y procesamiento de tejidos

En el laboratorio, el útero grávido fue diseccionado en su porción distal con el fin de evitar daños en los vasos sanguíneos, se extrajo el feto cuidadosamente, de inmediato el cordón umbilical fue identificado y cortado desde su base fetal, retirándose el feto para luego medir su diámetro biparietal con la regla de Vernier estimándose así la edad (Gazitua *et al.*, 2001). En seguida, de forma manual, las placentas fueron separadas del útero. Macroscópicamente las 12 placentas fueron estudiadas, sin embargo, se eligieron 2 placentas por cada tercio de gestación para realizar la repleción vascular conacrílico líquido y tinta china, mientras que las otras dos placentas restantes, por cada tercio de gestación, fueron empleadas para cortes histológicos y sus respectivos estudios microscópicos.

1. Estudio macroscópico

Para el análisis macroscópico, partiendo desde el cordón umbilical las doce placentas fueron estudiadas y comparadas entre sí, obteniendo un solo patrón de irrigación, sin embargo, para una mejor descripción se eligieron 2 placentas por cada tercio para realizar el protocolo de repleción vascular (Bustamante *et al.*, 2007), el cual consistió en inyectar en la arteria y vena umbilical una mezcla deacrílico líquido y sólido termoestable (proporción 3:1, ATB Marca Vitacryl), con tinta china. Siendo el color rojo para las arterias y azul para las venas. Se inyectó un total de 30, 90, 180 ml de la mezcla por cada vaso sanguíneo en cada trimestre de gestación respectivamente, dejándose reposar hasta que obtenga una fuerte contextura, finalmente se empleó la nomenclatura de la Nómina Anatómica Veterinaria 2012 para describir la irrigación.

2. Estudio microscópico

Para estudios microscópicos, las muestras de arteria y vena se obtuvieron realizando un corte de 2 cm al inicio del cordón umbilical para todos los tres tercios. Estas muestras se conservaron con solución de formalina tamponada al 10%, para ser procesadas con parafina (bloque de tejido o taco) y seccionadas en 5 μ de espesor y luego ser teñidas con hematoxilina-eosina (HE) (Schacter, 2012) tinción que permite identificar la forma muscular lisa. Adicionalmente, se realizó la tinción Tricrómico de Masson para diferenciar el tejido conectivo (colágeno) de las fibras musculares lisas, en las láminas histológicas de arteria y vena umbilicales del tercer tercio de gestación. Los cortes histológicos se analizaron con objetivos de 4x, 10x y 40x usando un microscopio binocular marca Leica, modelo DM750 con cámara ICC50 HD anexada y software LAS 4.7 Leica Macrosystems.

3. Estudio inmunohistoquímico

Al igual que en el estudio microscópico, los mismos bloques de tejidos parafinados (tacos) se emplearon para ser seccionadas en 5 μ de espesor y colocadas en láminas portaobjetos. Para la identificación de antígenos de angiotensina y endotelina, los cortes histológicos siguieron el protocolo de inmunohistoquímica ABC - técnica Avidina – Biotina – Peroxidasa (Doherty *et al.*, 1989) (anexo 1), el cual se empleó los anticuerpos y reactivos listados en la tabla 1.

Tabla 1.- Anticuerpos y reactivos empleados para la inmunohistoquímica en vasos sanguíneos de la placenta de alpaca.

Anticuerpo	Laboratorio
Rabbit anti-Human AGTR2. Catálogo N°P170170	US Biological Life Sciences Salem, MA. 01970
Rabbit anti Human EDNRA. Catálogo N°314388	US Biological Life Sciences Salem, MA. 01970
ImmPACT DAB Peroxidase Substrate Catálogo No. SK-4105	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010

Para el procesamiento de las muestras, las láminas con el tejido, fueron sometidas a un proceso inmunohistoquímico, el cual se inicia con la desintegración de la parafina con Neo Clear® por 20 minutos (2 tiempos de 10 minutos), continuándose la hidratación con etanol al 100% en dos inmersiones de 10 minutos, seguido de la inmersión de las láminas en una composición de 200 ml de Metanol y 4 ml de agua oxigenada por media hora con el fin de lograr el bloqueo de la enzima peroxidasa endógena.

Posteriormente, para la hidratación de las láminas, éstas se sumergieron en alcohol 96° (dos frascos), 70° y 50°, durante 5 minutos cada vez; continuando con tres lavados en buffer fosfato salino (PBS) durante 5 minutos. Se prosiguió, con la recuperación antigénica usando buffer citrato de pH 6.0 en el horno microondas a 750 W por un lapso de 10 minutos. Después de enfriarse, se realizó tres nuevas inmersiones en solución PBS (5 minutos cada vez).

Enseguida, durante 30 minutos a temperatura ambiente se realizó la inactivación de uniones inespecíficas con albúmina de suero bovino (BSA) al 1%.

Los anticuerpos primarios se aplicaron en cámara húmeda y se dejaron reposar en refrigeración hasta la mañana siguiente, continuándose, con tres inmersiones en solución PBS (5 minutos cada vez), después de esto, se aplicó el anticuerpo secundario (ambos policlonales) en cámara húmeda por 30 minutos, pasado los 30 minutos se aplicó la enzima AB en cámara húmeda y se dejó incubando por media hora a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron tres inmersiones de 5 minutos en solución PBS.

Se empleó el cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) para el revelado, y se observó marcación (positividad), presentándose a los 5 y 8 minutos para angiotensina y endotelina, respectivamente. La reacción se cortó con agua potable, siguiéndose una inmersión en agua potable y otra por 5 minutos con agua destilada, posteriormente se sumergió por 5 segundos en el colorante de contraste hematoxilina de Harris, y después fue enjuagado con agua potable para eliminar los restos del colorante.

En la última etapa del protocolo se realizó la deshidratación en concentraciones sucesivas de alcohol 50°, 70°, 96°, y etanol al 100% y Neo Clear (dos veces) por inmersiones de 5 minutos, luego se aplicó una gota de Bálsamo de Canadá para el montaje de la lámina cubreobjetos por 10 segundos, se dejó secar por 48 horas y se realizó la limpieza posterior de las láminas.

Para validar los anticuerpos, se empleó como control positivo, cortes de cordón umbilical de ovinos, mientras que el control negativo interno fue el corte histológico sin marcado de antígeno.

Las láminas fueron analizadas en el microscopio binocular Leica DM750 con cámara digital ICC50 HD/ anexada y software de medición LAS 4.7 Leica Microsystems. Se observó el grado de marcación de los antígenos para endotelina y angiotensina en arterias, denominándose, cualitativamente la intensidad del marcaje como 0: negativo o sin marcación, 1: marcación leve (+), 2: marcación moderada (++), 3: marcación fuerte (+++) (Zanuzzi, 2010).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se reporta por primera vez en nuestro país, la presencia de receptores de angiotensina II y endotelina en el músculo liso y endotelio de arteria y vena placentaria, empleando anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas moléculas en humanos mediante inmunohistoquímica, estos resultados constituyen aportes muy importantes en el conocimiento de la anatomía reproductiva de la placenta de alpaca.

Los resultados anatómico macroscópico e histológico hematoxilina – eosina y tricrómico de Masson basados en los tres tercios de gestación de la alpaca son los primeros que brindan nueva información adicional a los hallazgos ya descritos por investigadores en el año 2017.

1.- Descripción macroscópica de la irrigación placentaria partiendo desde el cordón umbilical

Las placentas de los tres tercios de gestación mostraron un único patrón de irrigación que parte desde el cordón umbilical, el tipo de placenta es epitelio corial difusa sin presencia de placentomas. El cordón umbilical de las alpacas presenta dos venas y dos arterias (Fig. 1), describiéndose así que, la sangre oxigenada materna es captada y transportada por la anastomosis venosa e irrigan al feto a través de dos grandes venas umbilicales (Fig. 2). Las dos grandes arterias umbilicales retornan la sangre fetal hacia la mucosa uterina (madre), cada arteria se subdivide en cuatro o más ramas arteriales de menor calibre, estas se ramifican y se distribuyen a lo largo de toda la placenta. Al contrario de las venas, las ramificaciones de las dos arterias umbilicales no presentan anastomosis. El mesénquima placentario presenta abundantes ramas vasculares desarrollándose una mayor irrigación en el lado de alojamiento del feto. No se observó carúnculas ni cotiledones.



Fig. 1. Irrigación placentaria de alpaca tercer tercio de gestación. Las flechas señalan la presencia de dos arterias (A) y dos venas (V) umbilicales, inyectados con tinta china, rojo para arterias y azul para venas, cada una de ellas se subdivide en cuatro a más ramas vasculares las cuales irrigan la placenta. El mismo patrón vascular se observó en los tres tercios de gestación.



Fig. 2. Irrigación placentaria venosa de alpaca tercer tercio de gestación. La flecha señala la anastomosis de venas de menor calibre (color azul), lo que demuestra una sola irrigación venosa. Esta característica se observó en las placentas de los tres tercios de gestación. Las arterias no demuestran dicha característica.

La unión uniforme del epitelio del corion a la mucosa uterina, y la ausencia de placentomas, corrobora una vez más que la placenta de alpaca es de tipo epitelio corial difusa. Estos resultados son respaldados por Dellman, (1993) y Olivera *et al.*, (2003), afirman que las alpacas tienen placenta epitelio corial difusa, y por Iturrizaga *et al.*, (2005), demostró que la placenta de las llamas no presenta carúnculas ni cotiledones.

En los tres tercios de gestación de la alpaca se evidenció dos grandes vasos arteriales y dos grandes vasos venosos. Las venas umbilicales son las únicas que forman anastomosis en las porciones terminales. Estos hallazgos son similares a los descritos en los tres tercios de gestación del cordón umbilical de los camellos, Sabah *et al.*, (2012); y en el último tercio de gestación de alpacas, Barrios *et al.*, (2017), ambos autores no señalan anastomosis en las venas.

2.- Descripción microscópica por tinción hematoxilina-eosina de arteria y vena umbilical

Primer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. Las tinciones de hematoxilina-eosina muestran claramente tres capas de revestimiento tanto en arterias como en venas placentarias. En ambos, la luz tiene forma irregular, así en las arterias la luz es ligeramente amplia y tiene forma estrellada (Fig. 3), mientras que en las venas la luz es estrecha y alargada (Fig. 4). A partir de la luz se identifica la primera capa denominada túnica interna o íntima, la cual está compuesta por una fila de células endoteliales que revisten la cara interna de la arteria. En seguida, una segunda capa, llamada capa muscular se subdivide en dos zonas, una zona compacta y otra esponjosa. La zona compacta presenta abundante tejido conectivo entremezclado con escasas fibras musculares lisas, mientras que la zona esponjosa presenta mayor cantidad de células musculares lisas dispuestas en anillos de manera circular alrededor del ducto. En las venas la subcapa compacta es menos amplia que en las arterias. Estas características se diferencian claramente en la tinción tricrómico de Masson. Finalmente, una tercera capa reviste los vasos sanguíneos, llamada capa externa, compuesta por tejido laxo (Fig. 3 y 4).

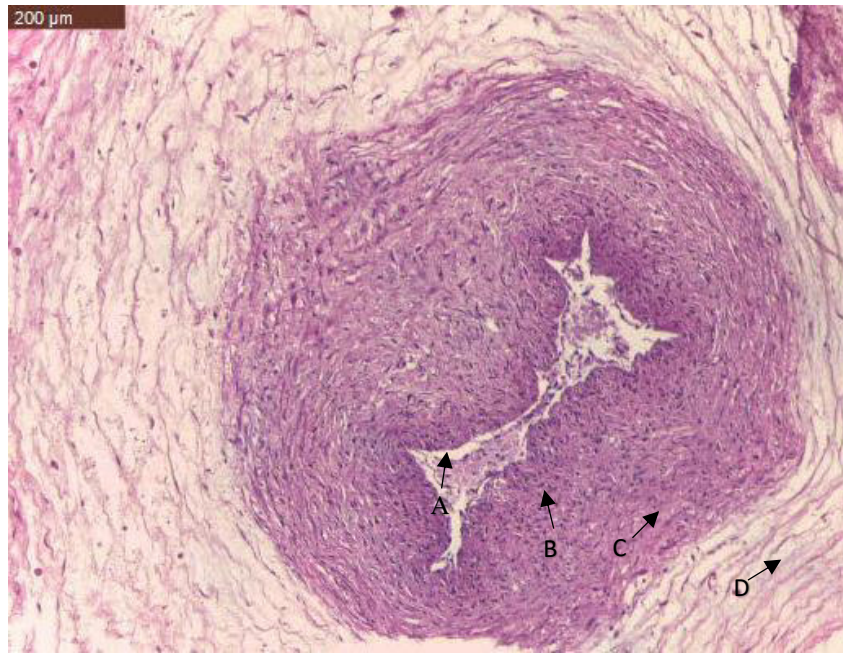


Fig. 3. Arteria umbilical, primer tercio de gestación (H&E 10x). La arteria presenta luz de forma estrellada, a partir de esta, las flechas señalan tres capas, la primera capa denominada capa íntima (A), una segunda capa llamada muscular subdividida en compacta (B) y esponjosa (C), y una tercera capa denominada capa externa compuesta por tejido laxo que reviste toda la capa muscular lisa (D).

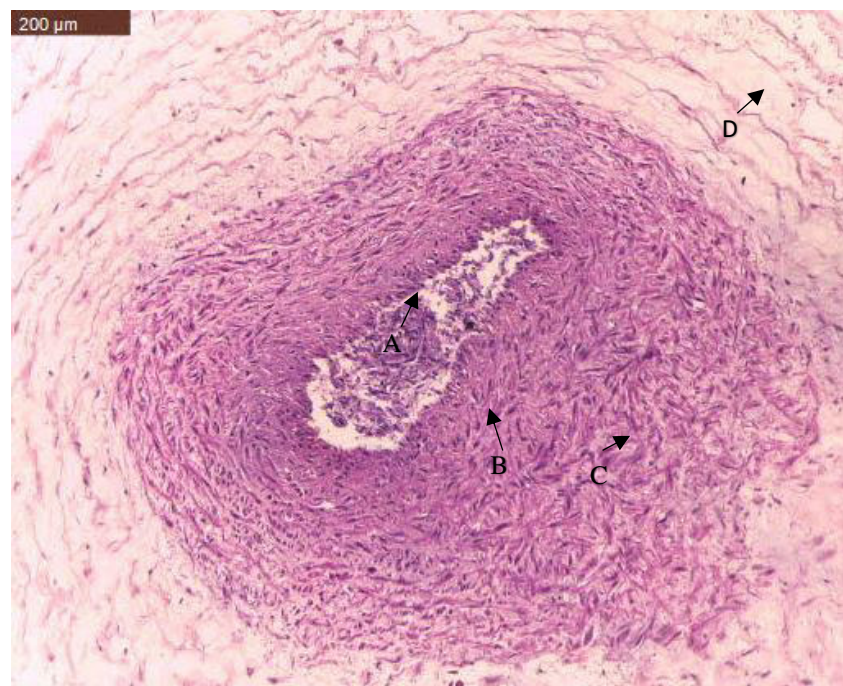


Fig. 4. Vena umbilical, primer tercio de gestación (H&E 10x). Las venas presentan luz de forma alargada, al igual que en las arterias, a partir de la luz, las flechas señalan la presencia de

tres capas. La primera capa denominada capa íntima (A), una segunda capa muscular subdividida en compacta (B) y esponjosa (C), y una tercera capa denominada capa externa compuesta por tejido laxo que reviste toda la capa muscular lisa (D).

Segundo tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el segundo tercio de gestación la luz de la arteria y vena continua con su forma irregular. Las tinciones muestran claramente tres capas de revestimiento. La primera capa o túnica interna está compuesta por una fila de células endoteliales que revisten la cara interna (Fig. 5), seguidamente, de una capa muscular el cual se divide en dos subcapas una compacta y la otra esponjosa. La subcapa compacta está compuesta por escasas células musculares lisas entremezcladas con abundante tejido conectivo lo cual le brinda una mayor resistencia. La subcapa esponjosa presenta abundantes ases musculares lisas que rodean todo el ducto sanguíneo (Fig. 6). La tercera capa externa es amplia por lo que se encuentra constituido por tejido laxo y rodea toda la capa muscular lisa. En las venas la subcapa compacta es menos amplia que las arterias (Fig. 7).

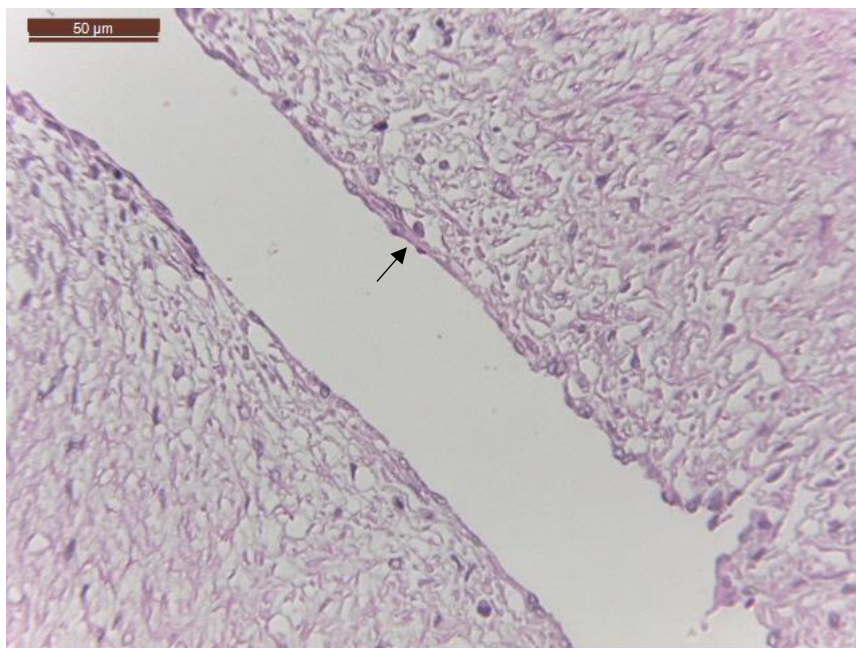


Fig. 5. Arteria umbilical, segundo tercio de gestación (H&E 40x). La flecha señala las células endoteliales de la capa interna que revisten la luz arterial.



Fig. 6. Arteria umbilical, segundo tercio de gestación (H&E 4x). En la capa muscular se observa claramente dos zonas, una compacta constituida por escasas células musculares lisas y abundante tejido conectivo (A) y otra esponjosa compuesta por abundantes células musculares lisas dispuestas en ases alrededor del ducto (B).

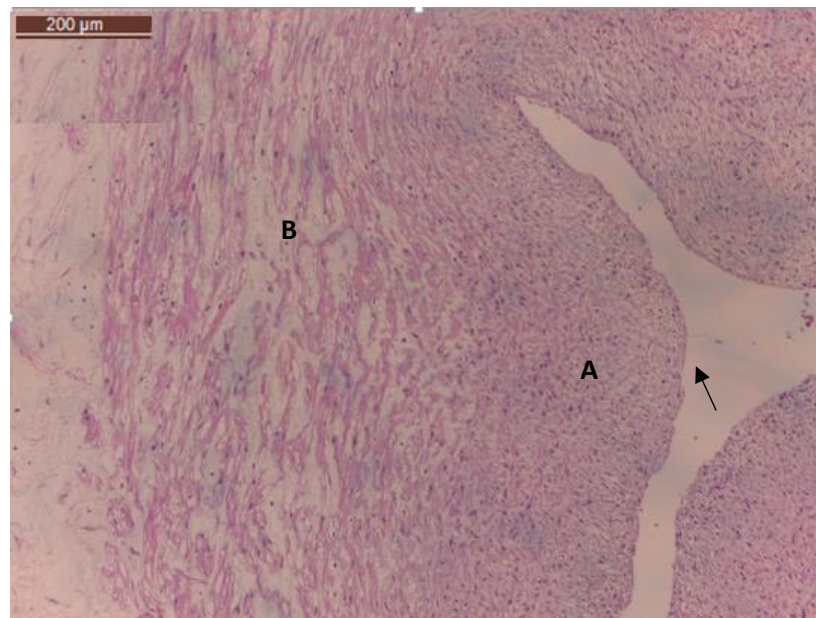


Fig. 7. Vena umbilical, segundo tercio de gestación (H&E 10x). Se señala la luz venosa de forma alargada, apartir de ahí una fila de celulas endoteliales reviste el piso vascular. En la segunda capa muscular, la zona compacta es menos amplia y se observan escasas celulas musculares lisas distribuidos en ases alrededor del ducto (A), mientras que la zona esponjosa es amplia con abundante las celulas musculares lisas (B).

Tercer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el tercer tercio de gestación la luz de la arteria tiene forma estrellada, mientras que la luz de la vena es alargada, ambos con forma irregular. Los cortes histológicos muestran claramente tres capas de revestimiento. La primera capa interna está compuesta por una fila de células endoteliales que revisten la cara interna, seguidamente, de una capa muscular el cual se divide en dos subcapas una compacta y la otra esponjosa. Para las arterias ambas subcapas muestran una semejanza en amplitud, la subcapa compacta mide $449.520\ \mu$ y la subcapa esponjosa $490.720\ \mu$ (Fig. 8). Sin embargo, las venas presentan una subcapa muscular compacta que mide $314.742\ \mu$ y una subcapa esponjosa de $731.002\ \mu$ que puede ser dos veces más amplia que la capa muscular (Fig. 9).

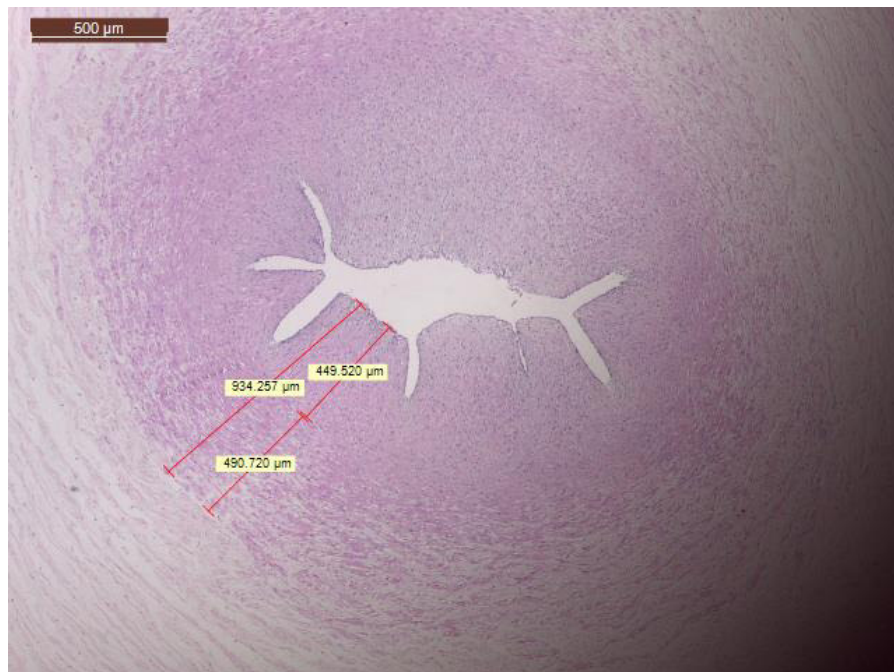


Fig. 8. Arteria umbilical, tercer tercio de gestación (H&E 4x). Se observa que ambas subcapas compacta y esponjosa presentan similitud en su amplitud.

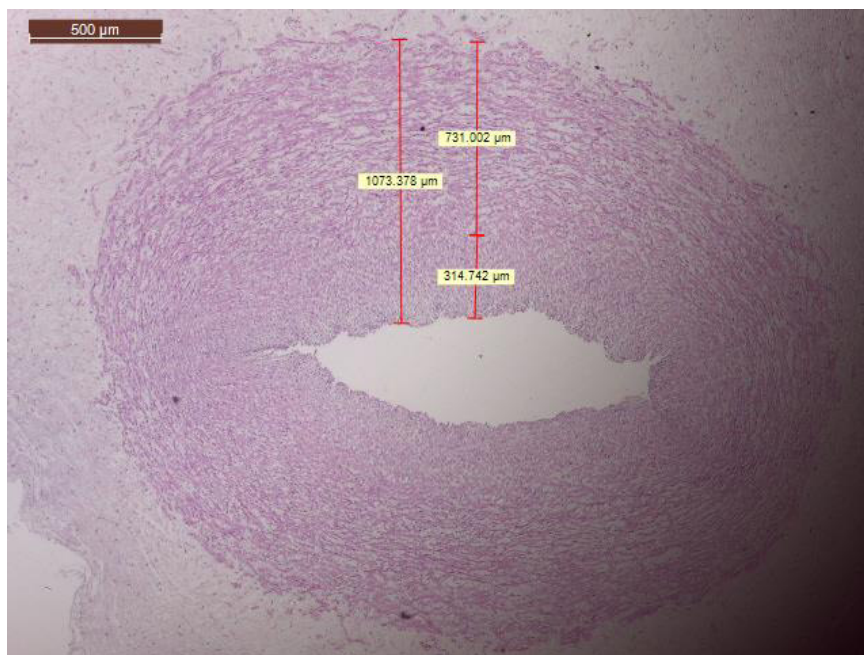


Fig. 9. Vena umbilical, tercer tercio de gestación (H&E 4x). Se observa que la subcapa esponjosa es dos veces más amplia que la primera subcapa compacta.

En los tres tercios de gestación las arterias y venas placentarias mostraron la luz del lumen estrellada y alargada respectivamente. A partir de la luz se ubica la túnica íntima que está constituido por una fila de células endoteliales que revisten la cara interna del vaso sanguíneo, en seguida una capa muscular es subdividida en subcapa compacta compuesta por tejido conectivo y subcapa esponjosa constituida por fibras musculares lisas, finalmente una amplia capa de tejido laxo reviste todo el ducto sanguíneo. Estos resultados son similares a los descritos por Barrios *et al.*, (2017), en cordón umbilical de la alpaca tercer tercio de gestación.

3.- Descripción microscópica por Tinción tricrómico de Masson de arteria y vena umbilical tercer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. La tinción Tricrómico de Masson permite diferenciar claramente las fibras musculares lisas de fibras colágenas o tejido conectivo. Las células coloreadas de rojo representan las células musculares lisas, mientras que las de color azul representan el tejido de sostén o fibras colágenas (Fig. 10 y 11).

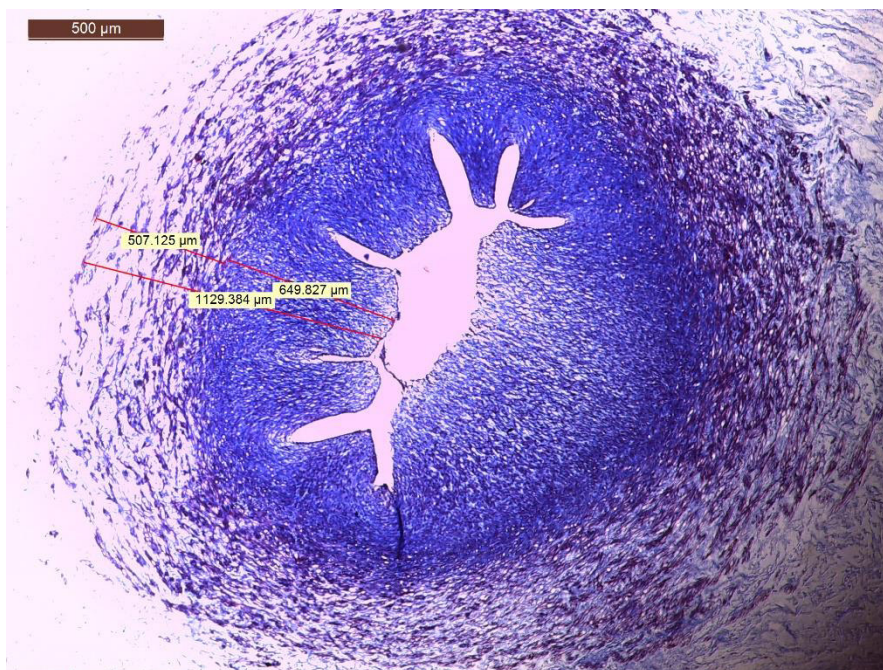


Fig. 10. Arteria umbilical, tercer tercio de gestación (Masson 4x). Se aprecia claramente la capa muscular en dos subcapas, una compacta (azul) compuesta por escasas células musculares lisas entremezcladas con fibras colágenas (649.827 μ) y otra esponjosa (roja) compuesta por abundantes células musculares lisas (507.125 μ).

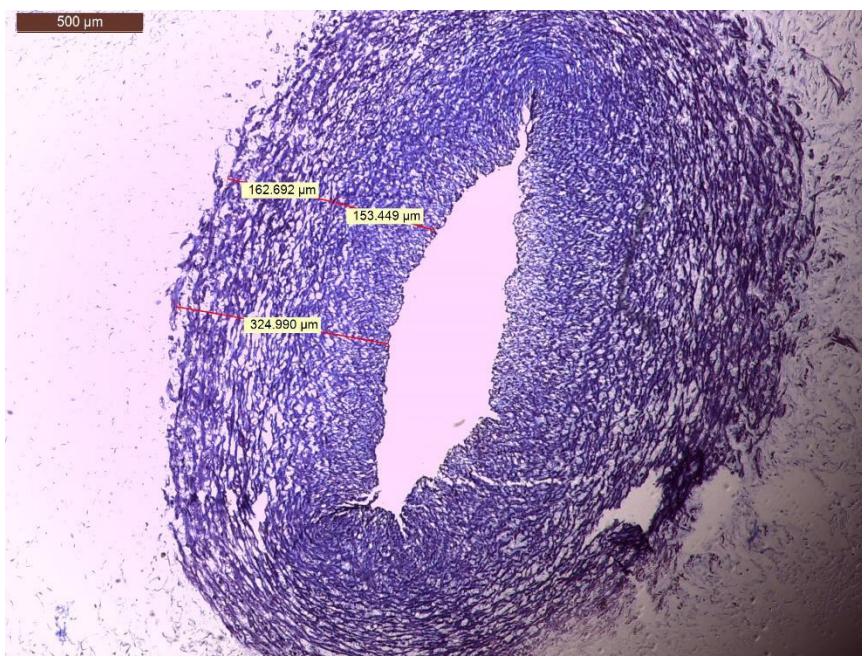


Fig. 11. Vena umbilical, tercer tercio de gestación (Masson 4x). Se observa que la capa compacta 153.449 μ tiene una amplitud mayor al de la capa esponjosa 162.692 μ .

Las arterias umbilicales presentan una túnica muscular amplia con abundante tejido colágeno (Barrios *et al.*, 2017). En la presente investigación la sub capa compacta de las arterias está compuesta por tejido colágeno y es más amplia que el de las venas, esta característica es una de las adaptaciones de la resistencia vascular arterial a grandes altitudes.

4.- Identificación mediante inmunohistoquímica de los antígenos de angiotensina y endotelina en las células de los vasos sanguíneos del cordón umbilical

Angiotensina

Primer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el primer tercio de gestación la arteria umbilical muestra una marcación fuerte (+++) del antígeno angiotensina en la subcapa esponjosa, es decir en la zona de mayor presencia de células musculares lisas (Fig. 12). En la vena umbilical, la marcación es moderada (++) en la subcapa esponjosa (Fig. 13). La fuerte y moderada intensidad de marcación antigénica para angiotensina es atribuida a la presencia de receptores de angiotensina II en las células musculares lisas, la cual cumplen la función de regular el caudal sanguíneo.

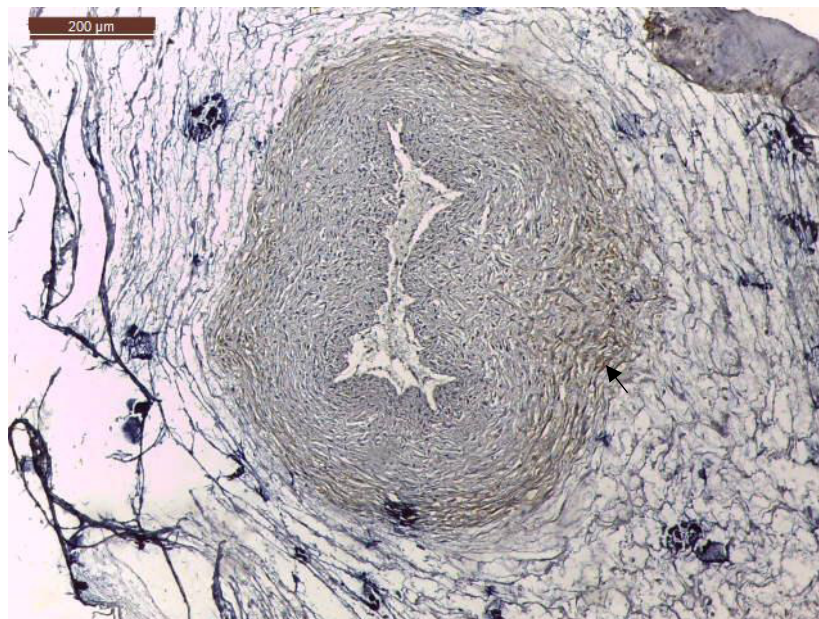


Fig. 12. Arteria umbilical, primer tercio de gestación. La flecha señala la intensidad fuerte (+++) del antígeno angiotensina en las células musculares lisas (IHQ, contraste H&E 10x).

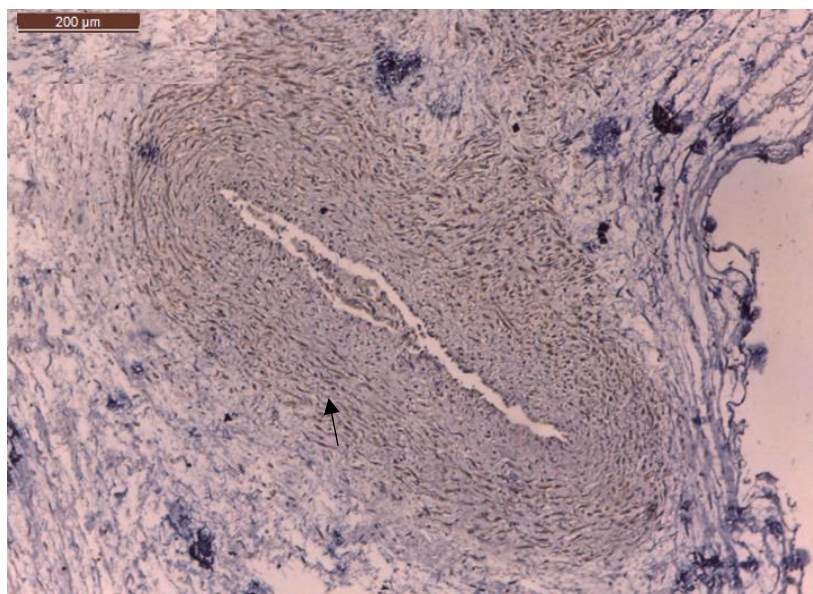


Fig. 13. Vena umbilical, primer tercio de gestación. Se señala la intensidad moderada (++) del antígeno angiotensina en la subcapa esponjosa (IHQ, contraste H&E 10x).

La identificación de antígenos receptores de angiotensina en el músculo liso vascular de las arterias y venas placentarias en los tres tercios de gestación de la alpaca es el primer aporte elemental en el conocimiento de la actividad biológica que ejerce la angiotensina II. Así, el Sistema Renina Angiotensina (RAS) incrementa la permeabilidad y estimula la angiogénesis durante la placentación, Mackenzie *et al.*, (1999).

Segundo tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el segundo tercio de gestación las tinciones continúan con la marcación fuerte del antígeno angiotensina en la capa muscular lisa subcapa esponjosa de la arteria (Fig. 14). Esta delimitación de marcaje se basa que en la subcapa esponjosa solo existen células musculares lisas ya que estas poseen los receptores para la molécula angiotensina, mientras que en la subcapa compacta existen escasas células musculares entremezcladas con abundante tejido conectivo, tal como fue observado en la tinción tricrómico de Masson. En las tinciones de las venas el marcaje es moderado y se observa en la subcapa esponjosa (Fig. 15)

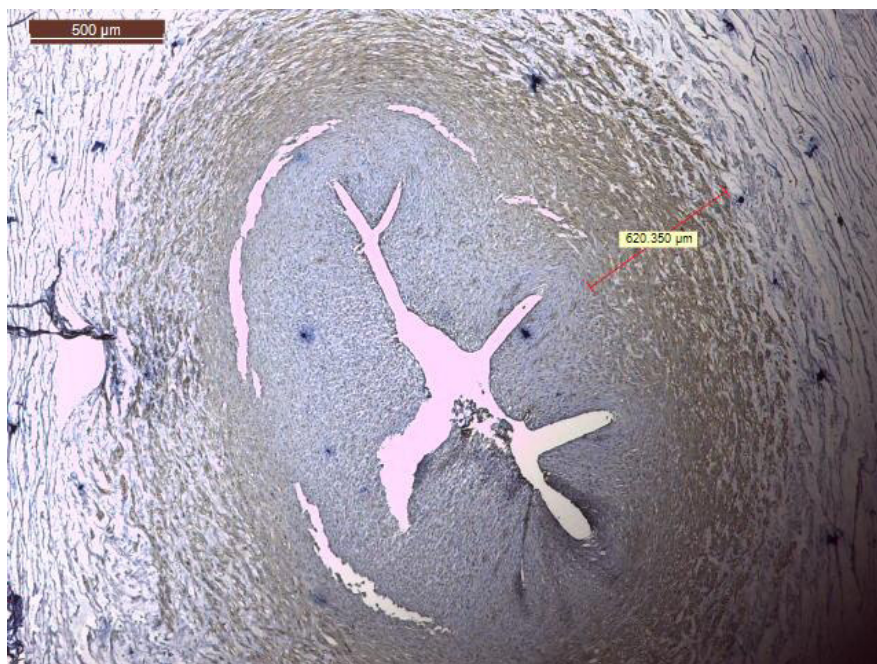


Fig. 14. Arteria umbilical, segundo tercio de gestación. Se observa la marcación fuerte (+++) del antígeno angiotensina que recubre toda la subcapa esponjosa 620.350 μ. Esta tinción demuestra que el antígeno angiotensina se encuentra en la pared celular del músculo liso (IHQ, contraste H&E 4x).

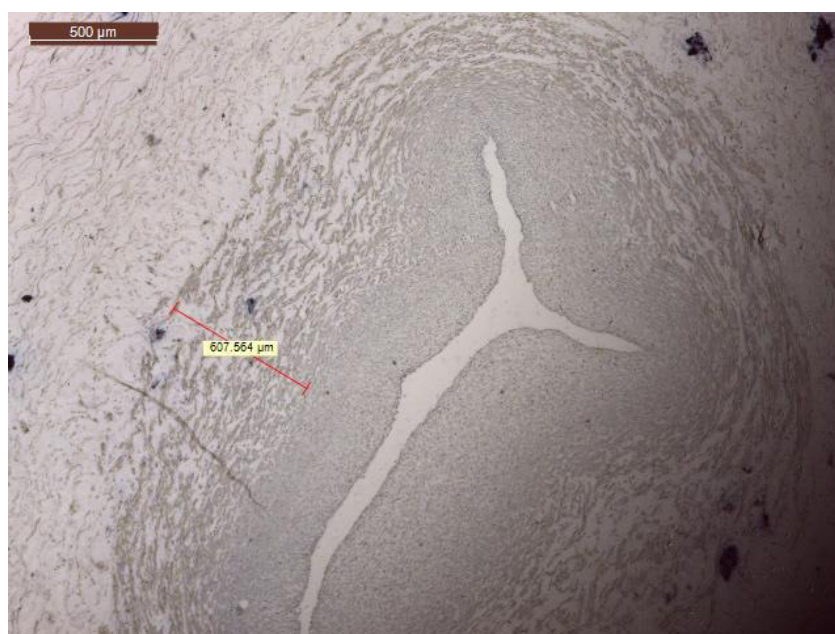


Fig. 15. Vena umbilical, segundo tercio de gestación. Del mismo modo que en el primer tercio, la intensidad moderada (++) de los antígenos de angiotensina se expone en la subcapa esponjosa 607.564 μ lugar de mayor presencia de celulares musculares lisas (IHQ, contraste H&E 4x).

La Angiotensina II es un agente muy potente que incrementa la presión sanguínea al actuar en el músculo liso, Kaschina & Unger (2003); regula la resistencia vascular y el flujo sanguíneo (Woods, 1993). Al identificarse los receptores de angiotensina II en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, estas actividades son claramente ejecutadas para asegurar una óptima irrigación feto placentaria que permita el crecimiento y la supervivencia fetal de la alpaca a grandes altitudes.

Tercer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el último tercio de gestación las tinciones de la arteria y vena umbilical muestra claramente la intensidad fuerte y moderada respectivamente de los antígenos receptores de angiotensina II en la capa muscular, subcapa esponjosa (Fig. 16 y 17). El marcaje es bien definido gracias a la innumerable cantidad de receptores para angiotensina responsable del control del flujo sanguíneo ubicados músculo liso.



Fig. 16. Arteria umbilical, tercer tercio de gestación. Obsérvese la intensidad fuerte (+++) de antígenos de angiotensina en células musculares lisas subcapa esponjosa 498.548 μ (IHQ, contraste H&E 4x).

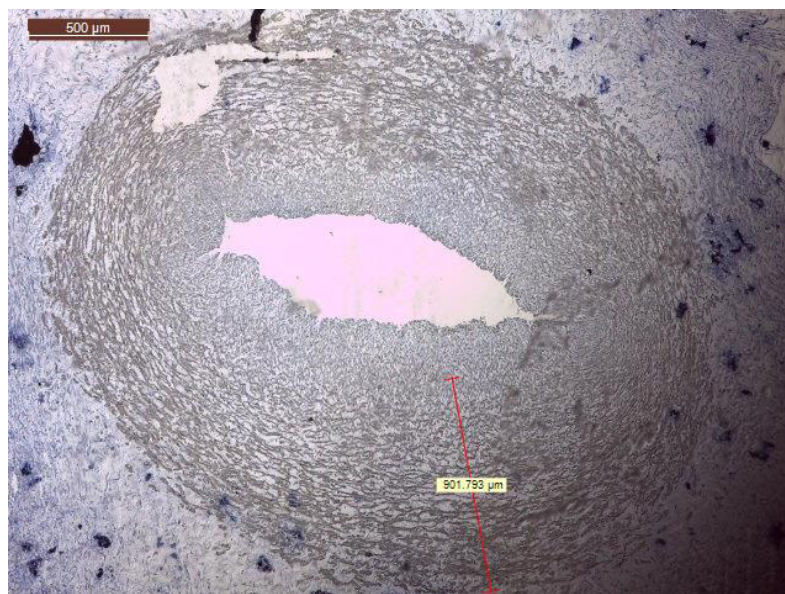


Fig. 17. Vena umbilical, tercer tercio de gestación. Obsérvese la intensidad moderada (++) de antígenos de angiotensina en células musculares lisas subcapa esponjosa 901.793 μ (IHQ, contraste H&E 4x)

El presente estudio, constituye el primer reporte para receptores de angiotensina II y endotelina en los vasos sanguíneos placentarios de los tres tercios de gestación de la alpaca.

La fuerte y moderada intensidad de marcación de antígenos de angiotensina en las células musculares lisas de las arteria y venas placentarias indican la gran actividad biológica de vasoconstricción que ejerce la angiotensina sobre el músculo liso vascular con el fin de sostener la óptima irrigación para la supervivencia y desarrollo fetal a gran altura.

Se ha demostrado que existen cantidades elevadas de receptores de angiotensina II en la irrigación placentaria de la mujer (Brameld *et al.*, 2011) y del cerdo (Nielsen *et al.*, 1996). En el presente estudio la alpaca es una nueva especie que se ha identificado receptores de angiotensina II en los vasos sanguíneos placentarios de los tres tercios de gestación.

Endotelina

Primer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el primer tercio de gestación los cortes histológicos muestran una marcación de intensidad moderada (++) de los antígenos de endotelina distribuidos en las células endoteliales de la túnica interna de la arteria y vena (Fig.18, 19, 20 y 21), estos hallazgos

indican la presencia de receptores para endotelina I en el endotelio vascular. No se aprecia intensidad de marcación en la subcapa esponjosa de las células musculares lisas de venas y arterias.

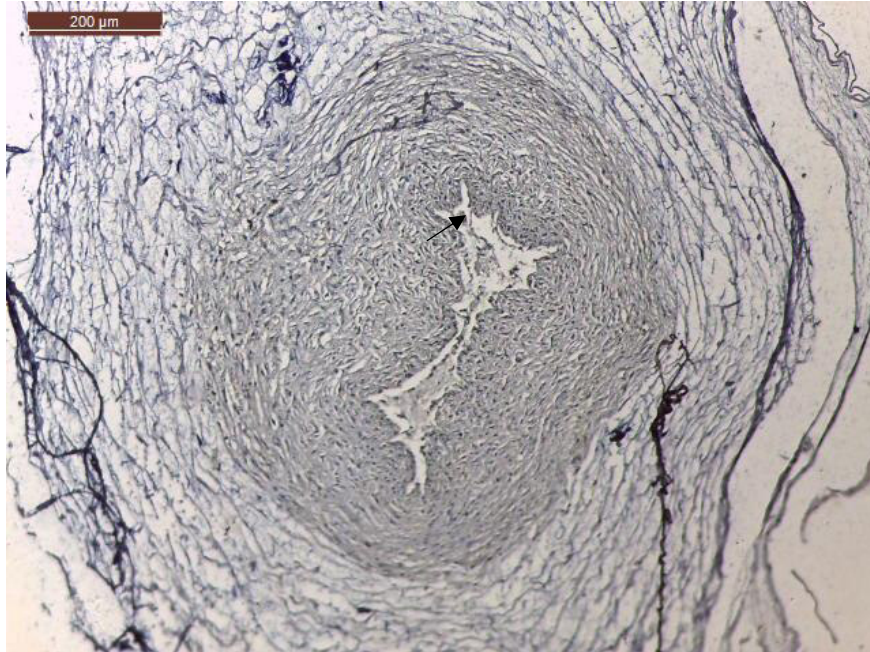


Fig. 18. Arteria umbilical, primer tercio de gestación. La flecha señala la intensidad moderada (++) de antígenos de endotelina en células endoteliales (IHQ, contraste H&E 10x).

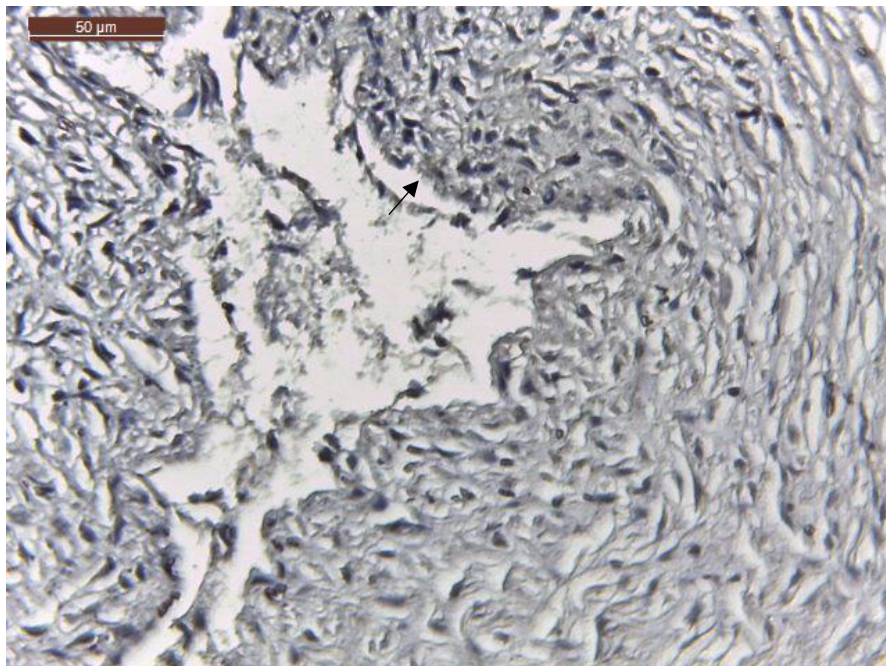


Fig. 19. Arteria umbilical, primer tercio de gestación. La flecha señala la intensidad moderada (++) de antígenos de endotelina en las células endoteliales (IHQ, contraste H&E 40x).

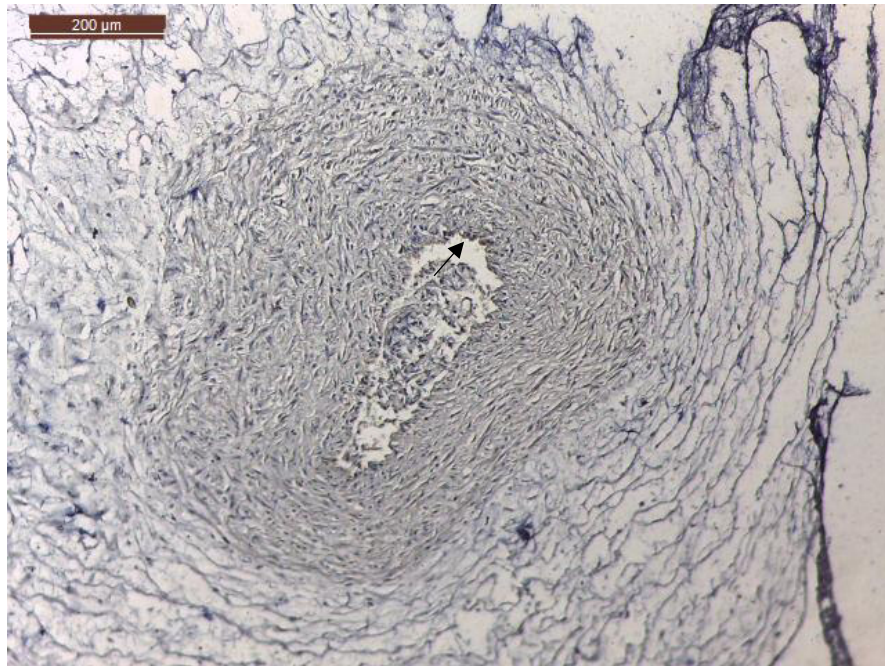


Fig. 20 vena umbilical, primer tercio de gestación. Obsérvese la intensidad moderada (++) de antígenos de endotelina en células endoteliales de la túnica interna (IHQ, contraste H&E 10x).

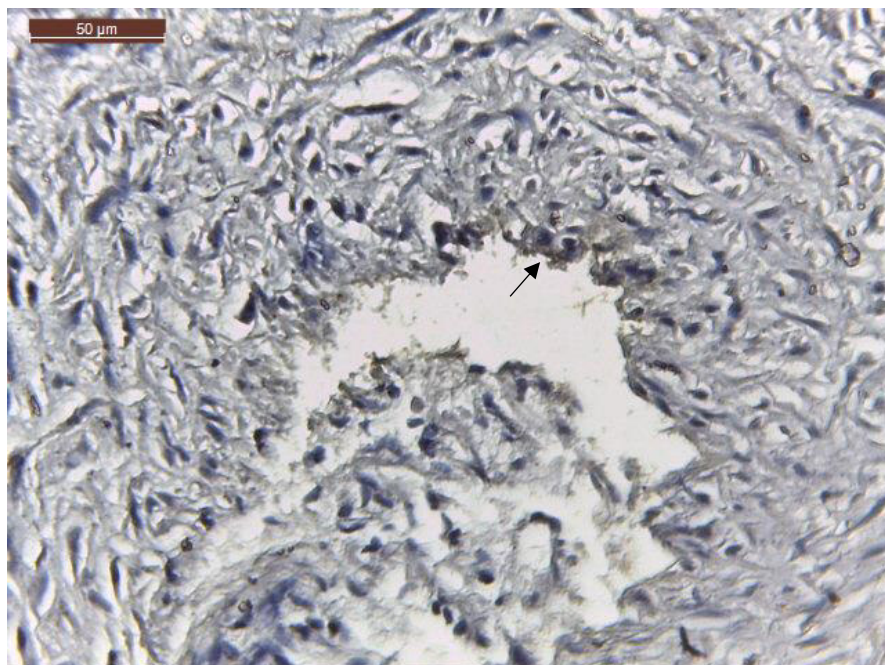


Fig. 21. Vena umbilical, primer tercio de gestación. La flecha señala la intensidad moderada (++) de antígenos de endotelina en células endoteliales de la túnica interna (IHQ, contraste H&E 40x).

La identificación de antígenos receptores de endotelina 1 en el endotelio vascular de arteria y vena placentaria en el primer tercio de gestación de la alpaca se convierte en el primer reporte elemental para el conocimiento de la actividad biológica de la endotelina en la formación de la red vascular placentaria, circulación feto placentaria, y el crecimiento fetal intrauterino (Krukier & Pogorelova, 2005).

Segundo tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el segundo tercio de gestación las tinciones de arteria y vena umbilical no demuestran intensidad de marcación en el endotelio vascular ni en la subcapa esponjosa, lugar de mayor presencia de células musculares lisas (Fig. 22 y 23).

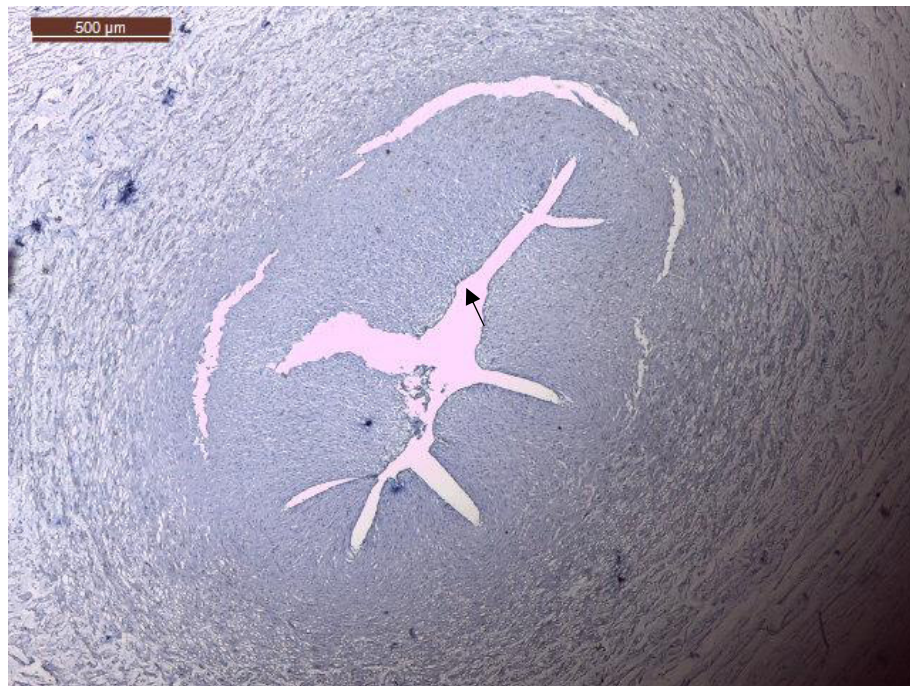


Fig. 22. Arteria umbilical, segundo tercio de gestación. La flecha señala la túnica interna sin marcación de intensidad para antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x).



Fig. 23. Vena umbilical, segundo tercio de gestación. La flecha señala el endotelio vascular sin marcación a antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x).

Tercer tercio de gestación

Arteria y vena umbilical. En el último tercio de gestación, la marcación para antígenos de endotelina en arterias y venas umbilicales es negativo (Fig. 24 y 25). No se logra observar marcación en el endotelio vascular.



Fig. 24. Arteria umbilical, tercer tercio de gestación. La flecha señala el endotelio vascular sin marcación de intensidad para antígenos de endotelina en células endoteliales (IHQ, contraste H&E 4x).

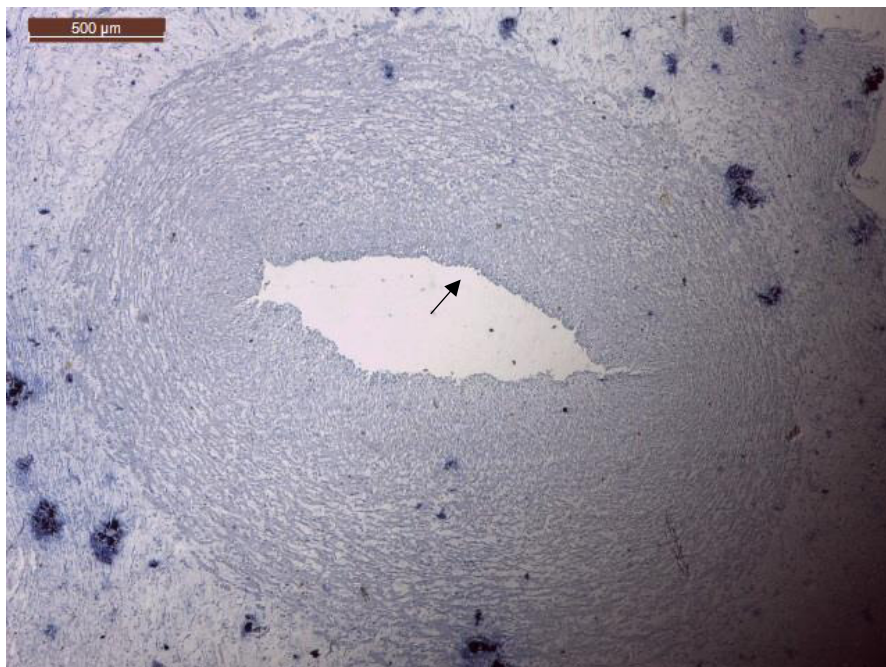


Fig. 25. Vena umbilical, tercer tercio de gestación. La flecha señala el endotelio vascular sin marcación de intensidad para antígenos de endotelina (IHQ, contraste H&E 4x).

Durante el primer tercio de gestación de la alpaca los receptores para endotelina 1 son expresadas en el endotelio de arteria y vena placentaria. Esta reacción puede atribuirse a la angiogénesis ejercida por la endotelina (Dvorak *et al.*, 1995), o a sus lugares específicos de receptores ET1 a lo largo de todos los vasos sanguíneos en la placenta humana (Robaut *et al.*, 1991). En el segundo y tercer tercio de gestación las arterias y venas fueron tejidos complejos desarrollados por lo que no se evidenció marcación de antígenos de endotelina.

Los receptores de angiotensina y endotelina identificados en el músculo liso y el endotelio vascular respectivamente, son parte de los resultados que brindan conocimiento básico para el conocimiento de la angiogénesis placentaria, actividad biológica y supervivencia fetal de la alpaca.

V. CONCLUSIONES

- En los tres tercios de gestación, el cordón umbilical de la alpaca presenta 2 arterias y 2 venas que se ramifican extensamente en todo el mesénquima placentario. Al contrario de las arterias, la irrigación venosa placentaria forma anastomosis, originando una sola irrigación.
- En los tres tercios de gestación, las arterias y venas placentarias presentan tres capas, íntima, muscular y laxa, visualizado con H&E y tricrómico de Masson, la capa muscular de las arterias se subdivide en una subcapa compacta compuesta por abundante tejido conectivo y escasas fibras musculares lisas, y otra subcapa esponjosa compuesta por abundantes células musculares lisas. En las venas la subcapa compacta es menos amplia, que el de la arteria.
- Los antígenos receptores de angiotensina II se encuentran distribuidos en las células musculares lisas de arterias y venas, estos antígenos se representaron en una fuerte y moderada marcación en los tres tercios de gestación, lo que indica una efectiva actividad biológica de la angiotensina.
- Los antígenos receptores de endotelina 1 se encuentran distribuidos en las células endoteliales vasculares del primer tercio de gestación, estos antígenos se representaron en una moderada marcación. No se observó marcación en el endotelio vascular del segundo y tercer tercio de gestación.

VI. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. **Allen A, Zhuo J, Mendelsohn F.** Localization and Function of Angiotensin AT1 Receptors. *AJH*–January 2000–VOL. 13, N°. 1, PART 232S;13:31S–38S
2. **Barrios LM, Rodríguez JL, Lopez B. 2017.** Histological characterization of umbilical cord in alpaca (*Vicugna pacos*). *Anatomia Histologia Embriologia*. DOI:10.1111/ahe.12298
3. **Brameld JM, Hold R, Broughton Pipkin F. 2011.** Regional variation in angiotensin converting enzyme activity in the human placenta. *Placenta* (36): 96-98.
4. **Burton M, Burton R, Marshall C. 2006.** Information Resources on the South American United States Department of Camelids: Llamas, Alpacas, Guanacos, and Vicunas. AWIC Resource Series No. 12.
5. **Bustamante MF, Prieto RH, Binvinat O. 2007** Preservation of Human Placenta. *Anatomical Technique* DOI 10.4067/S0717
6. **Cooper S, Walley Connel A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C. 2007.** Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(4):H2009-23
7. **Dellman, H. D. 1993.** Textbook of Veterinary Histology. 4th ed. Philadelphia, Lea & Febiger.
8. **Doherty MJ, Russo GG, Jolly HW, Stewart KR. 1989.** Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *J Am Acad Dermatol*. Pág. 827.
9. **Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak A, Am. J. 1995.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Pathol*.146, No. 5, 1029-1039.
10. **Faber JJ, Anderson DF. 1992.** Current topic: Water volume of the ovine conceptus. Point of view. *Placenta*; 13: 199-212.
11. **Flores N. 2013.** Endotelina-1: vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. *Revista Med*. 21 (2): 64-78
12. **Fowler ME, Olander HJ. 1990.** Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). *Am J Vet Res*. 51: 1495-1500
13. **Gazitua F, Corradine P, Ferrando G, Raggi L, Parraguez V. 2001.** Prediction of gestational age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*) *Anim Reprod Sci* 66:81-92.

14. **Gudea, N. M.; Roberts, C. T.; Kalionisa, B. & King, R. C. 2004** Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114:397-407
15. **Iñiguez, L, Alem R. 1996.** Role of camelids as means of transportation and exchange in the andean region of Bolivia. *World Animal Review* 86: 12-21
16. **Iturrizaga D, Verechia F, Santos T, Bombonato P, Teixeira D, Miglino M. 2005.** The materno-fetal inter -fetal interface in llama (*Lama guanicoe glama*). *Pesq. Vet. Bras.* 27(6):221-228.
17. **Kaschina E, Unger T. 2003.** Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalin and function. *Blood Press* 12:70-88.
18. **Krukier I, Pogorelova T. 2005.** Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Endothelin in the Placenta and Umbilical Cord during Normal and Complicated Pregnancy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 141, No. 2
19. **Mackenzie HS, Ziai F, Omer SA, Nadim MK, Taal MW. 1999.** Angiotensin receptor blockers in chronic renal disease. The promise of a bright clinical future. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 12 S283-S286.
20. **Ma Y, Zhang L, Peng T, Chegn J, Taneja S. Zhang J. 2006.** Angiotensin II stimulates transcription of insulin-like growth factor I receptor in vascular smooth muscle cells: role of nuclear factor k-B. *Endocrinology* 147(3):1256-63
21. **Nielsen AH, Hagemann A, Poulsen K. 1995.** The tissue renin-angiotensin sys- tem in the female reproductive tissues: A review. In: Mukhopadhyay AK, Raizada MK (eds). *Tissue renin-angiotensin systems: Current con- cepts of local regulators in reproductive and endocrine organs*. Plenum Press, New York. Ch. 15.
22. **Nielsen AH, Schauser K, Winther H, Datnzer V, Poulsen K. 1996.** Angiotensin II receptors and renin in the porcine uterus: myometrial AT2 and endometrial AT1 recptors are down regulated during gestation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24, 309,314.
23. **Nómina Anatómica Veterinaria. 2012.** International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, autorizado por General Assembly of the World Association of Veterinary Anatomist.
24. **Olivera L, Zago D, Leiser R, Jones C, Bevilacqua E. 2003.** Placentation in the alpaca *Lama pacos*. *Anatomy and Embryology*.DOI: 10.1007/s00429-003-0328-3
25. **Peach MJ. 1981.** Molecular actions of angiotensin. *Biochem farmachol*, 30, 2745-2751.
26. **Quispe EC. 2009.** Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*, 45, p.11–14. Doi:10.1017/S1014233909990277
27. **Risau W, Ingo F. 1995.** Vascularizacion. DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445
28. **Roa I, Smok C, Prieto R. Placenta. 2012.** Anatomía e Histología Comparada. *Int. J. Morphol.*, 30(4):1490-1496.
29. **Robaut C, Mondon F, Bandet J, Ferre F, Cavero I. 1991.** Regional Distribution and Pharmacological Characterization of Endothelin- 1 Binding Sites in Human Fetal Placental Vessels. *Placenta* vol 12.
30. **Sabah O, Elgouzoule and D.I. Osman. 2013.** Foetal circulation of the dromedary camel. *Research journal of veterinary science* 6 (1). DOI. 10.3923.rjvs.2013.11.19
31. **Schacter B, 2012.** Haematoxylin & Eosin Staining of Tissue Sections. SOP Number 08.03.007 e2.0.

32. **Steven DH, Burton GC, Sumar J, Nathanielsz PW. 1980.** Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*). DOI: 10.1016/S0143-4004(80)80013-0
33. **Urpegui G, Abenia I, Alfonso C, Sancho S, Escorial S, Vallés V. 2000.** Aspectos básicos de la inmunohistoquímica en el carcinoma de laringe. O.R.L. Aragon. Vol. 3: 13-16
34. **Woods LL. 1993.** Role of angiotensin II and prostaglandins in the regulation of uteroplacental blood flow. *Am. J. Physiol*; 264: R584-90.
35. **Yang C, David M, Wang Z, Stoll B, Lackeyram D, Kendall C. 2011.** Apical Na⁺-D-glucose cotransporter 1 (SGLT1) activity and protein abundance are expressed along the jejunal crypt-villus axis in the neonatal pig. *Am J Physiol- Gastr L* 300: 60-70.
36. **Zanuzzi C. 2010.** Efectos de la intoxicación con *Solanum glaucophyllum* (duraznillo blanco) sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular en el intestino de conejos. Tesis de Doctorado. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. 286 p.

VII. ANEXOS

ANEXO 1 PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ABC
DESINTEGRACIÓN DE PARAFINA: 10 minutos cada sumergida A.- Neo Clear 1 B.- Neo Clear 2
PRIMERA HIDRATACIÓN: 10 minutos cada sumergida A.- Etanol 100% B.- Etanol 100%
INICIO DEL BLOQUEO DE LA ENZIMA PEROXIDASA ENDÓGENA A. Metanol (200ml+ 4ml de agua oxigenada): media hora
SEGUNDA HIDRATACIÓN: 5 minutos cada sumergida en alcohol A.- Alcohol 96° B.- Alcohol 96° C.- Alcohol 70° D.- Alcohol 50°
INMERSIONES (3 LAVADOS): 5 minutos cada inmersión A.- Inmersión en PBS B.- Inmersión en PBS C.- Inmersión en PBS.
INICIO DE LA RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA: A.- Buffer citrato (pH 6) en horno microondas a 750 watts: durante 10 minutos B.- Dejar enfriar
INMERSIONES (3 LAVADOS): 5 minutos cada inmersión A.- Inmersión en PBS

B.- Inmersión en PBS
C.- Inmersión en PBS
INICIO DE LA INACTIVACIÓN DE UNIONES INESPECÍFICAS: Agregar BSA 1% en cámara húmeda a temperatura ambiente: media hora
APLICACIÓN DE ANTICUERPO PRIMARIO: (anticuerpo diluido 1:500) Agregar en toda la muestra en cámara húmeda y dejar reposar hasta la mañana siguiente en refrigeración.
INMERSIONES (3 LAVADOS): 5 minutos cada inmersión A.- Inmersión en PBS B.- Inmersión en PBS C.- Inmersión en PBS
APLICACIÓN DE ANTICUERPO SECUNDARIO (según el kit policlonal) Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
INMERSIONES (3 LAVADOS): 5 minutos cada inmersión A.- Inmersión en PBS B.- Inmersión en PBS C.- Inmersión en PBS
APLICACIÓN DE LA ENZIMA AB (según el kit policlonal): Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
INMERSIONES (3 LAVADOS): 5 minutos cada inmersión A.- Inmersión en PBS B.- Inmersión en PBS C.- Inmersión en PBS
INICIO DEL REVELADO: Aplicar DAB hasta observar marcación y apuntar el tiempo que demoró en marcar, cortar la reacción con agua potable.
INMERSIONES (2 LAVADOS): 5 minutos cada inmersión A.- Lavado en agua potable B.- Lavado en agua destilada
INICIO DE COLORACIÓN DE CONTRASTE: Hematoxilina de Harris: 5 segundos y enjuagar en agua potable para eliminar el excedente de colorante.
INICIO DE LA FIJACIÓN DEL COLORANTE: Agua corriente por 5 minutos
INMERSIÓN (ENJUAGUE): Agua destilada por 5 minutos
DESHIDRATACIÓN: 5 minutos cada sumergida A.- Alcohol 50° B.- Alcohol 70° C.- Alcohol 96°

D.- Alcohol 96°

E.- Etanol 100%

F.- Etanol 100%

G.- Neo Clear

H.- Neo Clear

FINALIZACIÓN CON MONTAJE:

Neomont o Bálsamo de Canadá: por 10 segundos. Limpieza de la lámina pasado las 48 horas con Neo Clear para retirar restos del producto.

ANEXO 2 MEDIDAS BIPARIETAL DEL FETO

N° DE MUESTRA	RAZA	TERCIO DE GESTACIÓN	EDAD MADRE APROX	FECHA DE COLECCIÓN	MEDIDAD BIPARIETAL (mm)	EDAD FETAL APROX.	OBSERVACIÓN
1	HUACAYA	PRIMER TERCIO	6	CONVENIO FONDECYT 2014	18.7	70 DÍAS	MACRO
2	HUACAYA	PRIMER TERCIO	5	23/05/2016	0.6	30 DÍAS	MACRO
3	HUACAYA	PRIMER TERCIO	5	CONVENIO FONDECYT 2014	19.0	80 DÍAS	MACRO Y MICRO
4	HUACAYA	PRIMER TERCIO	4	23/05/2016	12.2	50 DÍAS	MACRO Y MICRO
5	HUACAYA	SEGUNDO TERCIO	5	26/07/2016	28.5	140 DÍAS	MACRO
6	HUACAYA	SEGUNDO TERCIO	4	CONVENIO FONDECYT 2014	30.6	150 DÍAS	MACRO
7	HUACAYA	SEGUNDO TERCIO	5	28/07/2016	35.8	170 DÍAS	MACRO Y MICRO
8	HUACAYA	SEGUNDO TERCIO	6	29/07/2016	32.3	160 DÍAS	MACRO Y MICRO
9	HUACAYA	TERCERO TERCIO	6	19/09/2016	50.82	240 DÍAS	MACRO
10	HUACAYA	TERCERO TERCIO	7	CONVENIO FONDECYT 2014	60.08	270 DÍAS	MACRO
11	HUACAYA	TERCERO TERCIO	5	19/09/2016	54.2	250 DÍAS	MACRO Y MICRO
12	HUACAYA	TERCERO TERCIO	8	19/09/2016	66.36	300 DÍAS	MACRO Y MICRO